

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-295373
(43)Date of publication of application : 10.11.1998

(51)Int.Cl.

C12N 9/90
A23L 1/212
A23L 1/224
C12P 11/00

(21)Application number : 09-121641

(71)Applicant : HOUSE FOODS CORP

(22)Date of filing : 23.04.1997

(72)Inventor : SAWADA HIROSHI
IMAI SHINSUKE
ASATAKE MUNEAKI
HIRAO KO

(54) ENZYME FOR PRODUCING LACHRYMATORY FACTOR OF ONION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new enzyme for producing a lachrymatory factor capable of being produced by a simple operation, useful for improvement, etc., of flavor of an onion (a processed material) by allowing the enzyme to produce the lachrymatory factor from PeCS(' present in the onion, etc., in the coexistence of enzyme alliinase.

SOLUTION: This enzyme for producing a lachrymatory factor can produce the lachrymatory factor from PeCS0 present in an onion, etc., in the coexistence of an enzyme alliinase, and has the following physicochemical properties: activity: producing the lachrymatory factor from PeCS0 of a sulfur-containing compound present in the onion, etc., in the coexistence of the enzyme alliinase; substrate specificity: acting on a precursor formed from the PeCS0 present in the onion, etc.; optimum pH: 5.9–6.0; optimum temperature: 15–25°C; pH stability: stable at pH 5.0–9.0 in incubation at 15–25°C for 10–30 min; temperature stability: stable at ≤60°C in the incubation at pH 6.5 for 5 min; molecular weight: 18,000 (SDS-PAGE). The enzyme for producing a lachrymatory factor is obtained by adding water to the onion, pulverizing the onion with water, and extracting the pulverized onion.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 15.04.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3330305

[Date of registration] 19.07.2002

[Number of appeal against examiner's decision of

- **rejection]**
- **[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]**
- **[Date of extinction of right]**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-295373

(43)公開日 平成10年(1998)11月10日

(51)Int.Cl.⁶C 12 N 9/90
A 23 L 1/212
1/224
C 12 P 11/00

識別記号

P I

C 12 N 9/90
A 23 L 1/212
1/224
C 12 P 11/00

審査請求 未請求 請求項の数3 FD (全 8 頁)

(21)出願番号

特願平9-121641

(22)出願日

平成9年(1997)4月23日

(71)出願人 000111487

ハウス食品株式会社

大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号

(72)発明者 澤田 博

大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号

ハウス食品株式会社内

(72)発明者 今井 兵介

大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号

ハウス食品株式会社内

(72)発明者 堀武 宗明

大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号

ハウス食品株式会社内

(74)代理人 弁理士 須藤 政彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】玉葱の催涙性物質生成酵素

(57)【要約】

【課題】玉葱の催涙性物質生成酵素を提供する。

【解決手段】酵素アリイナーゼの共存下で玉葱等に存在するP e C S Oから催涙性物質Lachrymatory Factorを生成する催涙性物質生成酵素、また、玉葱に水を加えて砕碎し、抽出することを特徴とする前記の催涙性物質生成酵素の製造方法。

【効果】新規催涙性物質生成酵素を提供することができ、また、酵素を、玉葱等から比較的簡便な操作により製造することができる。本酵素は、酵素アリイナーゼの共存下で玉葱等に存在するP e C S Oから催涙性物質L F(即ち、香り成分)を生成する作用を有するので、例えば、玉葱又は玉葱加工品の香味の改善等に利用することができる。

(2)

特開平10-295373

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵素アリイナーゼの共存下で玉葱等に存在するPeCSOから催涙性物質Lachrymatory Factorを生成する催涙性物質生成酵素。

【請求項2】 以下の理化学的性質：

(1) 作用：玉葱等に存在する含硫化物のPeCSOから酵素アリイナーゼの共存下で催涙性物質Lachrymatory Factorを生成する作用を有する。(2) 基質特異性：酵素アリイナーゼの共存下で、玉葱等に存在するPeCSOから生成した前駆物質に作用する。(3) 至適pH：pH 5.0～6.0。(4) 至適温度：15～25°C。(5) pH安定性：15～25°C、10～30分のインキュベートにおいてpH 5.0～9.0で安定。(6) 温度安定性：pH 6.5、5分のインキュベートにおいて60°C以下で安定。(7) 分子量：約18000 (SDS-PAGE電気泳動法)、約25000～28000 (FPLCゲル通過法)、を有する請求項1記載の催涙性物質生成酵素。

【請求項3】 玉葱に水を加えて破碎し、抽出することを特徴とする請求項1記載の催涙性物質生成酵素の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、酵素アリイナーゼの共存下で、玉葱等に存在するPeCSOから生成した前駆物質に作用して催涙性物質を生成する酵素に関するものであり、更に詳しくは、玉葱等に存在する含硫化物のPeCSOから酵素アリイナーゼの共存下で生成される催涙性物質Lachrymatory Factor (以下催涙性物質LFという) を生成する新規催涙性物質生成酵素とその製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】玉葱を切断したり、すり潰したりすると揮発性の催涙性物質LFが生成される。玉葱におけるこの催涙性物質LFについて、Virtanenらは、玉葱からその前駆物質の単離を行い、これを (+)-S-(1-ブロペニル)-L-システインスルフォキシド (PeCSO, 図9中、3で示される物質) と同定し、更に、催涙性物質LFを1-ブロペニルスルファン酸 (図9中、11で示される物質) と同定した (Spare, C. G. and Virtanen, A. I., Acta Chem. Scand., 17, 641, (1963))。その後、Brodnitzらは、合成により、催涙性物質LFがチオブロバール-S-オキシド (図9中、12で示される物質) であることを確認している (Brodnitz, M. H., and Pascale, J. V., J. Agric. Food. Chem., 19, 269, (1971))。

【0003】玉葱における催涙性物質LFの形成及びその分解については、これまで、多くの研究成果が報告されているが、上記催涙性物質LFの生成メカニズムについては、上記前駆物質のPeCSOに酵素アリイナーゼ

が作用して生成されると考えられていた。即ち、催涙性物質LFが生じるメカニズムとして、従来は、前駆物質のPeCSOに酵素アリイナーゼが作用し、スルファン酸を経て非酵素的に安定な催涙性物質になると考えられていた。しかし、本発明者の研究したところによれば、実際に、上記成分は酵素アリイナーゼの作用だけでは生じず、他の酵素の関与が不可欠であることが判明した。そこで、本発明者は更に鋭意研究を積み重ねた結果、上記スルファン酸を異性化して催涙性物質LFを生成すると考えられる新しい酵素の存在することを見い出すと共に、上記前駆物質は、当該酵素の作用の如何によって、催涙性物質LF (即ち、香り成分) あるいはこれと別の風味成分になることが分かった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記新規な知見に基づいて完成されたものであり、玉葱等に存在する催涙性物質LFの前駆物質に作用して当該催涙性物質LFを生成する新規催涙性物質生成酵素及びその製造方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、酵素アリイナーゼの共存下で玉葱等に存在するPeCSOから催涙性物質を生成する催涙性物質生成酵素、である。また、本発明は、以下の理化学的性質：

(1) 作用：玉葱等に存在する含硫化物のPeCSOから酵素アリイナーゼの共存下で催涙性物質Lachrymatory Factorを生成する作用を有する。(2) 基質特異性：酵素アリイナーゼの共存下で、玉葱等に存在するPeCSOから生成した前駆物質に作用する。(3) 至適pH：pH 5.0～6.0。(4) 至適温度：15～25°C。(5) pH安定性：15～25°C、10～30分のインキュベートにおいてpH 5.0～9.0で安定。(6) 温度安定性：pH 6.5、5分のインキュベートにおいて60°C以下で安定。(7) 分子量：約18000 (SDS-PAGE電気泳動法)、約25000～28000 (FPLCゲル通過法)、を有する前記の催涙性物質生成酵素、である。更に、本発明は、玉葱に水を加えて破碎し、抽出することを特徴とする前記の催涙性物質生成酵素の製造方法、である。

【0006】

【発明の実施の形態】以下に、本発明について更に詳細に説明する。本発明の酵素は、好適には玉葱等を原料として、抽出、精製し、製造されるが、原料として、玉葱と同様に、上記酵素含有材料であれば、玉葱以外のものを使用することができる。本発明の酵素の抽出、精製工程として、以下の方法が好適なものとして例示される。即ち、例えば、玉葱を原料とし、これを水で加水し、ミキサー等で破碎する。得られた破碎物を遠心し、その上澄み液を塩析して蛋白質を沈澱させる。次いで、上記沈澱物をリン酸バッファー等の緩衝液に溶解し、遠心し、

(3)

特開平10-295373

3

その上澄み液を粗酵素液として採取する。ここで、緩衝液としては各種のものが使用できるが、例えば、リン酸カリウムバッファー、クエン酸バッファー、酢酸バッファー、酒石酸バッファー、コハク酸バッファー、マレイン酸バッファー、Tris-HClバッファー、クエン酸-リン酸バッファー等が例示される。次に、上記方法によって得られた粗酵素液を、例えば、ハイドロキシアバタイト、硫酸塩析、透析、陰イオン交換、ゲル通過等の手段を適宜組合させて、精製処理することにより、精製酵素標品とすることができる。粗酵素液からの本酵素の精製は、上記方法に限らず、公知の分離、精製方法が適用できるが、例えば、粗酵素液から硫酸塩析法、有機溶媒沈殿法などにより粗酵素蛋白を得て、更に、これをイオン交換、ゲル通過、アフィニティー等の各種クロマトグラフィーを適宜組合せることによって精製処理することができる。

【0007】本酵素は、酵素アリナーゼの共存下で玉葱等に存在する含硫化物のPeCSOより生成される前駆物質に作用し、催涙性物質LFを生成することから、当該酵素の働きを、例えば、pH、温度条件の調整、酵素活性阻害剤の適用等により調整することにより、上記前駆物質の反応経路を制御することが可能であり、これにより、スルフェン酸の催涙性物質LF（即ち、香り成分）への移行又は別の風味成分への移行をコントロールすることができる。したがって、酵素アリナーゼと本酵素を組合せることによって、例えば、玉葱に存在する上記PeCSOから前駆物質、催涙性物質LFへの変化を制御して、玉葱及びその加工品の香味と刺激性を調整することが可能となり、例えば、玉葱特有の香味の増強されたオニオンパウダー、所望の風味、香りを有するフレーバー、催涙作用を有する薬品などの玉葱加工品を製造することが可能となる。

【0008】

【実施例】次に、実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明は当該実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例1

(1) 酵素の抽出粗精製

玉葱3個(790g)に蒸留水を1リットル加水し、ミキサーで破碎した。高速遠心機で5°C、8000rpm、5分遠心し、その上澄み液(回収: 1.5リットル)に硫酸アンモニウム709g加え(7.0%飽和)塩析し、蛋白質を沈殿させた。高速遠心機で5°C、8000rpm、5分遠心し、上澄み液は捨て、沈殿物をバッファーA 1リットルに溶解した(バッファーA: pH 6.5, 5.0 mMリン酸Kバッファー)。高速遠心機で5°C、12000rpm、15分遠心し、上澄み液(回収: 1リットル)を粗精製液とした。

【0009】(2) ハイドロキシアバタイト処理

1.5cm×1.5cm×30cmのカラムにハイドロ

4

キシアバタイト高速流速タイプ(和光)をつめて、バッファーAで平衡化した。次いで、上記粗精製液を流速3.5ミリリットル/minでPassさせ、Passさせた液(回収: 900ミリリットル)をPass液とした。

【0010】(3) 濃縮及び透析

上記Pass液900ミリリットルに硫酸アンモニウム424.8g加え(7.0%)塩析し、蛋白質を沈殿させた。高速遠心機で5°C、12000rpm、5分遠心し、上澄み液は捨て、沈殿物をバッファーA 100ミリリットルに溶解した。分子量10000以下の物質を通す透析膜を用いて上記の溶解液を透析するために、まずバッファーA 1リットルを用いて4°C下1時間透析した。上記の操作を2回繰り返し、バッファーA 1リットルを用いて4°C下17時間透析した。透析チューブから液を取り出し(回収: 105ミリリットル)、これを透析後液とした。

【0011】(4) 陰イオン交換処理と濃縮

1.0cm×1.0cm×25cmのカラムにDE52(ワットマン)をつめた(7.8.5ミリリットル)。バッファーAで平衡化し、透析後液を流速3.5ミリリットル/minでDE52に吸着させた。次いで、バッファーA 100ミリリットルで洗浄し、pH 6.5のりん酸Kバッファー(5.0 mM-5.00 mM: 500ミリリットル、5.00 mM: 120ミリリットル)で溶出した。その結果を図1に示す。次いで、図1の斜線の部分を分取して(回収: 1.20ミリリットル)、分取した液に硫酸アンモニウム5.6.7g加え(7.0%)塩析し、蛋白質を沈殿させた。高速遠心機で5°C、20000rpm、5分遠心し、上澄み液は捨て、沈殿物をバッファーA 3ミリリットルに溶解し、陰イオン交換後液とした。

【0012】(5) ゲル通過処理と保存

0.8cm×0.8cm×70cmのカラムにG-100(ファルマシア)をつめた(1.26ミリリットル)。バッファーAで平衡化し、陰イオン交換後液を3ミリリットルアブライした。流速り、3.3ミリリットル/minでバッファーAを流した。その結果を図2に示す。次いで、図2の斜線の部分を分取して(回収: 2.5ミリリットル)、-80°Cで凍結保存した。

【0013】(6) 本酵素の確認方法

単離精製したニンニク由来のアリナーゼとPeCSOを反応させた時、本酵素が存在しないと催涙性成分(チオプロバナール-S-オキシド)は全く生じない。このことを利用してHPLCで催涙性成分の生成の有無を測定することで、本酵素の存在を確認することができる。また、ニンニクアリナーゼの代わりに、例えば、Mazelessの方法によって単離精製した玉葱由来アリナーゼを用いても催涙性成分は全く生じないが、本酵素の確認を目的とするには、より安定なニンニクアリナ

(4)

特開平10-295373

5

ーゼを用いるのが便利である。

【0014】以下の方法により、本酵素の確認を行った。

- 1) アリイナーゼと本酵素を適当な割合で復合する。
- 2) PeCSOを添加し1分間、酵素反応をさせる。
- 3) クロロフォルムを加えて酵素反応を止め、同時に催化性成分をクロロフォルム層に転溶する。
- 4) HPLC (HPLC: 高速液体クロマトグラフィー)で測定する。

(条件)

カラム: シリカゲル

温度: 0°C

流速: 1ミリリットル/min

移動相: 2% イソプロパノール/n-ヘキサン

検出器: UV 254 nm

【0015】(7) 本酵素の性質

1) 本酵素の純度確認

上記の精製操作によって得られた酵素標品は、SDS-PAGE電気泳動で唯一であることを確認した。SDS-PAGE電気泳動の結果を図3に示す。SDS-PAGE電気泳動の結果、サブユニットの分子量は約18000であった。FPLCのゲル通過の結果、分子量は約25000~28000であった。

【0016】2) 本酵素の活性測定

酵素活性は、適濃度のPeCSO液に本酵素とニンニクアリイナーゼを同時に適量加え、所定の時間反応させた後、生成した催化性成分の量をHPLCで測定することによって測定した。尚、生成したチオプロバナール-S-オキシドの量はUVλ_{max} (max(e): 254 (5160) nm) であることをを利用して計算した。また、酵素活性は、反応1分間当たりチオプロバナール-S-オキシドを1 μmol 1生じる酵素量を1 unitと定義した。

【0017】3) 本酵素の精製過程における比活性
本酵素の精製過程における比活性を測定した。尚、蛋白質はsilver-Fluor法を用いて測定した。その結果を図4に示す。

【0018】4) 本酵素の温度安定性

精製した本酵素1ミリリットルを1.5ミリリットルチューブに入れ37°C、60°C、95°Cの条件で1、3、5、10、30分インキュベートした。次いで、これらを0°Cで5分冷却し反応前の温度を一定にした。活性測定の結果(図5)、37~60°Cで安定であった。

【0019】5) 本酵素のpH安定性

pH 3.0、4.0、5.0、6.5、7.5、9.0の5.0 mMリン酸Kバッファーを作製し、バッファーBとした。精製した本酵素100 μlにバッファーB 900 μlを加えて10分、30分室温でインキュベートした。活性測定の結果(図6)、10~30分インキュベートでpH 5.0~9.0において安定であ

った。

【0020】6) 本酵素の至適pH

pH条件を変えて、pH 5.5を10りとしたときの活性の強さを調べた。その結果を図7に示す。本酵素の至適pHは5.0~6.0であった。

【0021】7) 本酵素の至適温度

温度条件を変えて、20°Cを100としたときの活性の強さを調べた。その結果を図8に示す。本酵素の至適温度は15~25°Cであった。以上により、本酵素が前記した理化学的性質を有していることを確認した。

【0022】以下に、本酵素の作用を利用した各種応用例について説明する。

応用例

(1) 玉葱加工品

玉葱を、前記の酵素反応を生起せず、酵素アリイナーゼ及び本酵素が失活し、PeCSOが残存した状態の加工品として適宜の形態で提供することが可能となる。具体的には、剥皮した粗破物乃至ホールの玉葱を加熱処理、アルコール浸漬処理等により上記の状態の加工品とすることができる。加熱処理はポイリング、電子レンジ、遠赤外線、レトルト処理等により、玉葱の中心品温が80°C以上で5分以上保持されるような条件で行なえばよい。アルコール浸漬処理は、エタノール等に1日程浸漬することで行なうことができる。加工品は、乾燥処理したパウダー、粗破物等の適宜の形態とすることができる。

【0023】従来、一般に食品加工に用いられている玉葱パウダーは、製造工程で前記の酵素反応を起こし、PeCSOが消耗した状態のものであるため、催化性物質を生成できず、玉葱本来の風味、香りを呈し難い所があった。これに対して、上記懸念の加工品では、これを食品加工等に用いた場合に、他の原料(玉葱等)に含まれるアリイナーゼ乃至本酵素が、製品中のPeCSOと反応して、玉葱本来の風味、香りを呈することが可能となる。この場合、乾燥した製品の中にアリイナーゼ乃至本酵素を各々適量含むように配合し、使用時に水和して上記の品質のものを得るようになることも可能である。

アリイナーゼとしてはニンニク由来のものが安定性が高く好ましい。また、各酵素の量を調整することにより、得られる風味、香りの質及び量を適宜調整することができ。例えば、本酵素の反応を進めてより風味、香りがシャープな製品とすることが可能であり、また、これを抑えてマイルドな製品とすることが可能である。

【0024】特に、上記方法により得られる玉葱パウダーは、玉葱本来の風味、香りを有し、苦味が強く苦味が少ないので、例えば、シチュー、カレー、ラーメンのスープ、スナック菓子等の原料として、また、調味料として従来製品にない優れたものとなる。当該玉葱パウダーの好適な製造例を以下に示す。

50 (製造例) 玉葱3個(750g)を電子レンジで10分

(5)

特開平10-295373

7

加熱し、水500ミリリットルを加えて破碎した後、-80°Cで薄く凍結した。次いで、これを凍結乾燥機で30°Cで48時間乾燥して、PeCSOの含置約500mgの玉葱パウダー50gを得た。

【0025】(2) 玉葱フレーバー

PeCSO、アリイナーを及び本酵素を油系ベースに分散させることにより、玉葱フレーバーを調製することができる。油が介在する状態では上記の3成分は反応せず、例えば、当該フレーバーが食品等に用いられた場合に、水和されて所望の風味、香りを呈する。この場合も、上記の3成分の置を変えることによりその品質を適直調整することができる。

【0026】(3) 目薬

上記(1)と同様にして調製したパウダーを用いて目薬を調製することができる。点眼時に酵素反応が進んで催涙性物質が生成することにより催涙作用が奏されるので、例えば、当該目薬は、涙欠乏症(ドライアイ)等の治療に効果を奏する。

【0027】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明によれば、新規催涙性物質生成酵素を提供することができ、また、*

* 酵素を、玉葱等から比較的簡便な操作により製造することができる。本酵素は、酵素アリイナーゼの共存下で玉葱等に存在するPeCSOから催涙性物質LF(即ち、香り成分)を生成する作用を有するので、例えば、玉葱又は玉葱加工品の香味の改善等に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】陰イオン交換クロマトグラフィーにおける本酵素(図の斜線部分)の溶出パターンを示す。

10 【図2】ゲル通過における本酵素(図の斜線部分)の溶出パターンを示す。

【図3】SDS-PAGE電気泳動の結果を示す。

【図4】本酵素の精製過程における比活性を示す。

【図5】本酵素の温度安定性の測定結果を示す。

【図6】本酵素のpH安定性の測定結果を示す。

【図7】本酵素の至適pHを調べた結果を示す。

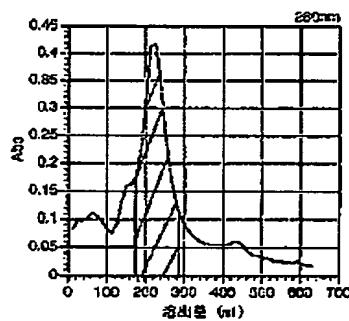
【図8】本酵素の至適温度を調べた結果を示す。

【図9】玉葱における催涙性物質の形成と分解についての説明図を示す。

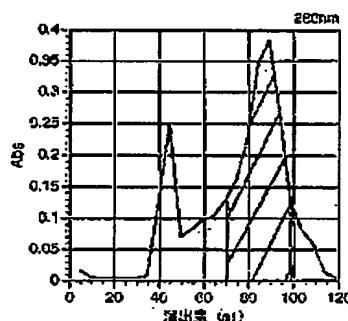
【符号の説明】

E2：本発明の催涙性物質生成酵素

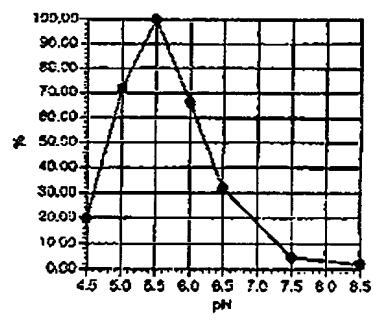
【図1】



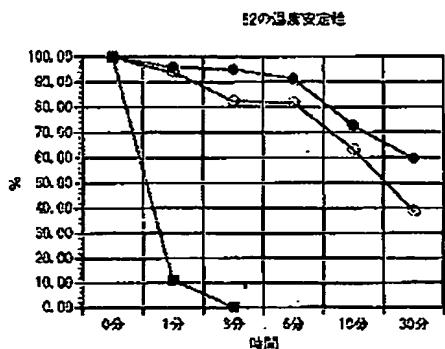
【図2】



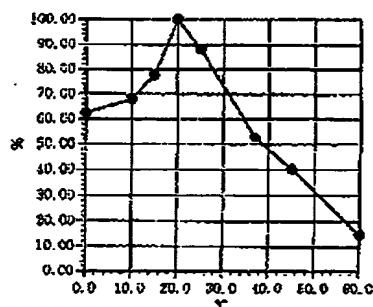
【図7】



【図5】



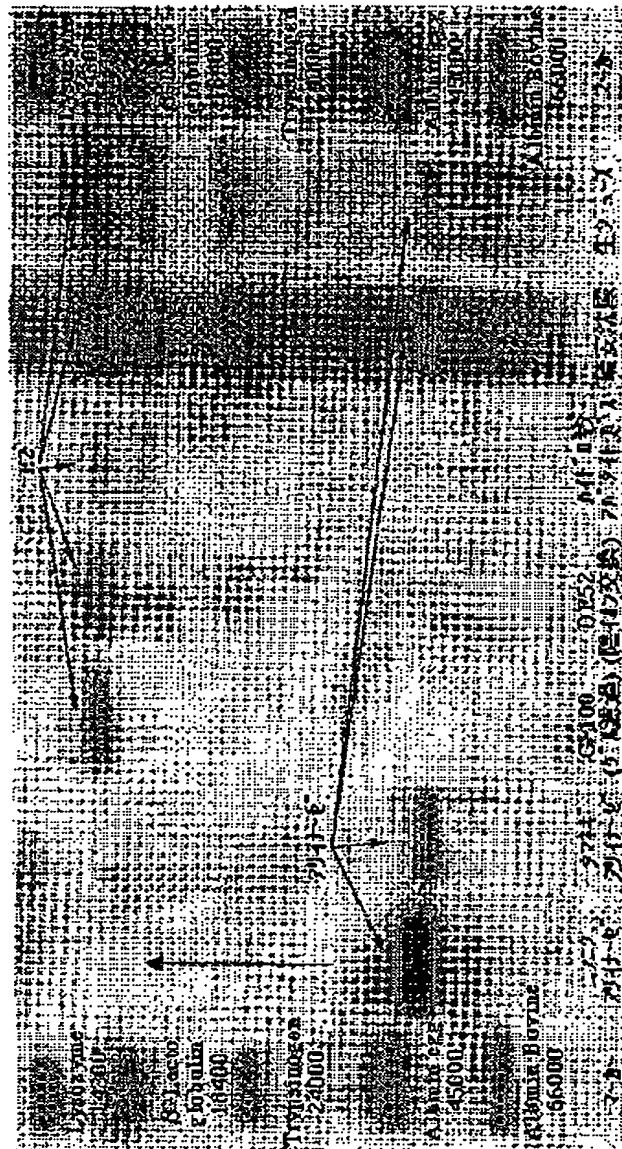
【図8】



(5)

特許平10-295373

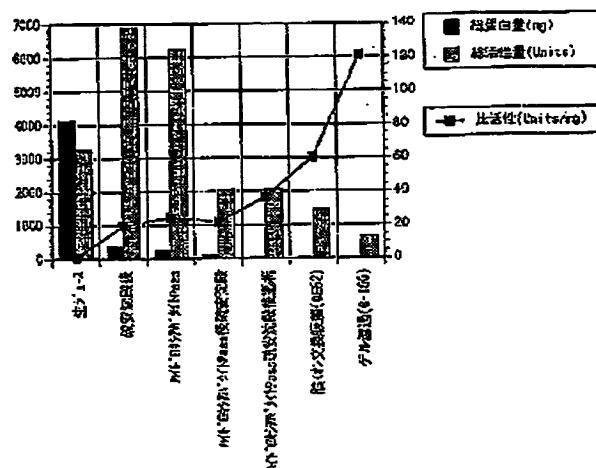
【図3】



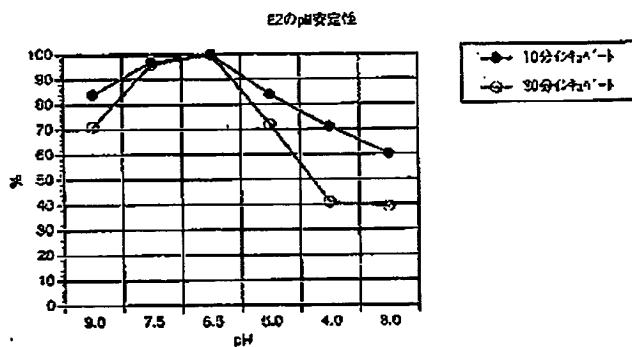
27

特開平10-295373

[图4]



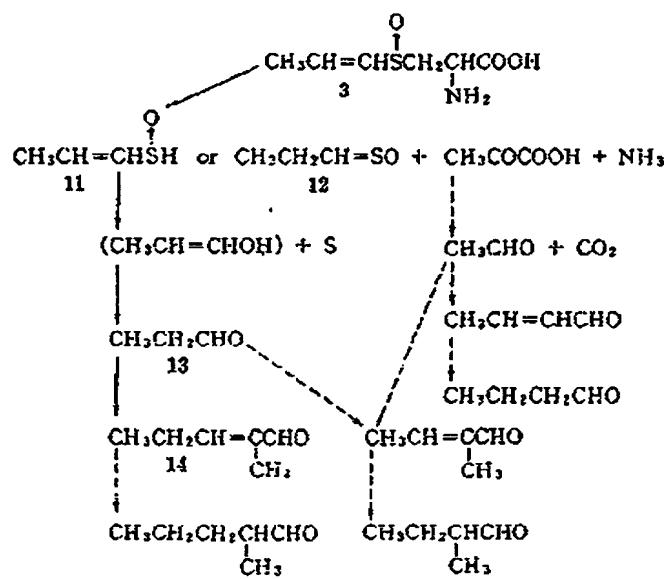
[图6]



(8)

特開平10-295373

【図9】



フロントページの続き

(72)発明者 平尾 香
 大阪府京大阪市御厨栄町1丁目5番7号
 ハウス食品株式会社内